台灣農業研究 (J. Taiwan Agric. Res.) 62(2):184–194 (2013)
DOI: 10.6156/JTAR/2013.06202.08

利用薄膜培養基法檢測褐根病菌分泌之生體外分解酵素

蔡志濃 [1] 鄭秀芳 [2] 蔡惠玲 [2] 黃鴻章 [3] 謝文瑞 [4] 安寶貞 [5,*]

摘要

蔡志濃、鄭秀芳、蔡惠玲、黃鴻章、謝文瑞、安寶貞。2013。利用薄膜培養基法檢測褐根病菌分泌之生體外分解酵素。台灣農業研究 62(2):184–194。

褐根病為近年來台灣普遍發生的木本植物根部病害之一，被為害植物的根系組織嚴重腐敗。本文利用薄膜培養基測試法探討褐根病菌分泌 10 種細胞外泌酵素 (extracellular enzymes) 之能力。試驗結果顯示分別分離自南投縣、高雄市等地區所採集罹病植株之 5 支褐根病菌供試菌株 (PN18.1：分離自南投縣中興新村之櫸木；PN22.1：南投縣國姓鄉之木麻黃；PNG1.1：南投縣水里鄉之葡萄；PNP1.1：高雄市甲仙區之梅樹；及 PNZ1.1：高雄市阿蓮區之印度棗) 皆能分泌澱粉分解酵素 (amylase)、纖維分解酵素 (cellulase)、果膠分解酵素 [pectinases, 含 polygalacturonases (PGs) 與 pectate transeliminases (PTEs)]、蛋白分解酵素 (protease)、磷酸分解酵素 (phosphatase)、尿素分解酵素 (urease)、脂質分解酵素 (lipase) 及木質分解酵素 (laccase)；但不能分泌磷脂分解酵素 (phosphatidase) 與幾丁質分解酵素 (chitinase)。除木質分解酵素外，各菌株分泌各種分解酵素的能力隨酵素種類的不同而有強弱之差異，可達到 5% 顯著性水準。然而所有供試菌株分泌木質分解酵素的活性均甚高。本研究所建立褐根病菌分解酵素之檢測技術，可進一步應用於褐根病菌致病機制之研究。

關鍵詞：褐根病、褐根病菌、細胞外泌酵素、木質分解酵素、聚碳酸酯膜。

前言

褐根病 (Brown root rot) 由 *Phellinus noxius* (Corner) G. H. Cunningham 引起 (Cunningham 1965)，遍佈亞洲、非洲、大洋洲及澳洲等亞熱帶地區，其寄主範圍廣泛，包括果樹、木本觀賞植物及林木等，目前全世界有記錄之寄主植物超過 200 餘種 (Ann *et al.* 2002)。在台灣，澤田兼吉 (Sawada 1928) 曾於 1928 年最早記錄 16 種作物受褐根病菌為害，當時菌名為 *Fomes lamaensis* (Murr) Sacc. et Trott.。近年來調查之結果，顯示台灣已發現的寄主超過 130 餘種 (species) (Ann *et al.* 2002; Tsai 2008)，為目前引起我國木本植物枯死之最重要根部病原菌 (Ann & Ko 1992; Ann *et. al.* 1999a, 1999b; Chang 1992; Tsu *et al.* 2002)。由於該病菌為木材腐朽菌 (wood decay fungus)，在國際間研究較多者為 laccase [木質分解酵素 (lignase) 之一種] (Geiger *et al.* 1985, 1986a, 1986b)，而其他分解酵素則較少 (Geiger *et al.* 1985,1986b)，尤其是生體外分解酵素。

本試驗即為參考與修改 Hankin & Anagnostakis 開發的固體培養基酵素檢測法 (Hankin & Anagnostakis 1975, 1977)，探討該菌在固態培養基上分泌酵素的能力；然而該菌在固態培養基上菌絲生長密實，不容易觀察

投稿日期：2013 年 3 月 1 日；接受日期：2013 年 5 月 2 日。
* 通訊作者：pjann@ tari.gov.tw
1 農委會農業試驗所植物病理組副研究員。台灣 台中市。
2 農委會農業試驗所植物病理組研究助理。台灣 台中市。
3 農委會農業試驗所植物病理組講座研究員。台灣 台中市。
4 國立中興大學植物病理系教授。台灣 台中市。
5 農委會農業試驗所植物病理組研究員兼組長。台灣 台中市。

08-安寶貞.indd 184 2013/7/8 下午 04:22:32

酵素分泌的反應情形，因此配合 Chang *et al.* (1992) 開發的薄膜法，將薄膜鋪在培養基上，阻隔病菌菌絲直接生長入培養基內，檢測時再將薄膜連同菌絲移除，以利酵素反應的判讀。本文即報告利用薄膜法測定不同褐根病菌株在固態培養基上分泌細胞外泌酵素的情形。

材料與方法

供試菌株

選取 5 個分離自不同寄主與不同地點的褐根病菌株供試，包括分離自南投縣國姓鄉木麻黃之菌株 PN22.1、南投縣水里鄉葡萄之菌株 PNG1.1、南投縣中興新村櫸木之菌株 PN18.1、高雄市甲仙區梅樹之菌株 PNP1.1 及高雄市阿蓮區印度棗之菌株 PNZ1.1。

菌株分泌生體外酵素的測定

參考並稍微修改 Hankin & Anagnostakis (1975, 1977) 開發的方法，測定供試菌株在固體培養基上分泌生體外酵素的能力。測試前，各菌株分別移植於馬鈴薯葡萄糖瓊脂培養基 (potato dextrose agar, potato 200 g, dextrose 20 g, agar 15 g, H_2O 1 L, PDA)，置於 24℃之定溫箱中無光照培養 5 d 之後，在菌落邊緣切下 5 mm × 5 mm 菌絲塊，移植於覆蓋一層聚碳酸酯膜 (polycarbonate membrane; 0.2 μm in pore diameter and 90 mm in disc diameter; Nuclepore Co., Pleasanton, CA, USA) (Chang *et al.* 1992) 的各種測試培養基中央培養，以分析不同菌株分泌各種不同生體外酵素之能力。測試每一種酵素時，各供試菌株各接種 4 個培養皿，試驗重複一次，試驗結果並經過統計分析，比較分泌酵素能力的差異性是否顯著。各種分解酵素的測定方法分述如下。

澱粉分解酵素 (amylase; Hankin & Anagnostakis 1975)：以營養瓊脂 (nutrient agar; NA) (Difico Co. USA) (Schaad 1980) 為基礎培養基，加入 0.2% 可溶性澱粉 (soluble starch) (Sigma, USA) 為基質 (substrate)，以 1 N HCl 將酸鹼值調為 pH 6.0，經高溫高壓殺菌釜滅菌後製成平板 (9 cm diam.)，每皿約含 20 mL 培養基。俟培養基凝固後，再將一層滅菌後之聚碳酸酯膜平鋪於平板上，接種培養 5 d 的褐根病菌菌絲塊 (0.5 cm diam.)，於 24℃無光照定溫箱中培養 4–5 d。爾後，將聚碳酸酯膜連同菌絲取出，以 1% 碘液 (iodine solution) 約20 mL為染劑 (test reagent) 浸潤測試平板，對照平板呈藍紫色，而具有澱粉分解酵素的部位，會有澄清區出現，測量澄清環直徑，並以無接種褐根病菌者為對照處理。無反應之培養基為藍紫色或暗褐色。

纖維分解酵素 (cellulose; Hankin & Anagnostakis 1977)：配製 CMC 培養基，以添加礦物鹽液 (mineral salt solution) 的酵母抽出培養基 (yeast extract agar) 為基礎培養基 [每公升含 1 g yeast extract (Difico, USA)、500 mL 礦物鹽液及 15 g Bacto agar；礦物鹽液的濃度為每公升含 2 g $(NH_4)_2SO_4$、4 g KH_2PO_4、6 g Na_2HPO_4、0.2 g $FeSO_4 \cdot 7H_2O$、1 g $CaCl_2$、10 μg H_3BO_3、10 μg $MnSO_4$、70 μg $ZnSO_4$、50 μg $CuSO_4$ 及 10 μg MoO_3]，以 0.5% carboxymethylcellulose (Sigma, USA) 為基質，滅菌前並以 1 N HCl 調整酸鹼值為 pH 5.0。滅菌後製成平板，再將聚碳酸酯膜覆蓋平板上，接種褐根病菌菌絲塊，於 24℃無光照定溫箱中培養 4–5 d。取出聚碳酸酯膜後，以 0.4% 剛果紅 (congo red) 溶液為測試染劑，每一培養皿倒入 20 mL 浸潤 10 s 後倒掉，靜置 15 min 後以清水潤洗，測量黃色澄清環大小，並以無接種褐根病菌者為對照處理。無反應者為淡紅色，但無淡黃色透明澄清環。

果膠分解酵素 (pectinases, pectolytic enzymes; Hankin & Anagnostakis 1975)：以添加礦物鹽液的酵母抽出培養基 (yeast extract agar) 為基礎培養基 (同纖維分解酵素之基礎培養基)，加入 5 g pectin (Sigma, USA) 為基質，滅菌前以 1 N HCl 將酸鹼值調為 pH 5.0，以測試 polygalacturonase (PG)，或以 1 N NaOH 將酸鹼值調為 pH 7.0，以測試 pectate transeliminase (PTE) (pectate lyase)。培養基滅菌後

製成平板，將聚碳酸酯膜覆蓋於平板上後，接種褐根病菌，於 24℃無光照定溫箱中培養 4–5 d 後，將聚碳酸酯膜取出，以 1% 十六烷基三甲基溴化铵 (hexadecyltrimethyl ammonium bromide, Acros Organics) 水溶液為測試劑，浸潤測試平板，觀察去除薄膜之平板上是否有澄清環出現。測量澄清環大小，並以無接種褐根病菌者為對照處理。無反應者無透明澄清環。

蛋白分解酵素 (protease; Hankin & Anagnostakis 1975)：以 NA 為基礎培養基，白明膠 (gelatin, Merck, Germany) 為基質，將 0.4% gelatin 加入 NA 中，以 1 N HCl 將酸鹼值調為 pH 6.0，經殺菌釜滅菌後製成平板，將聚碳酸酯膜覆蓋於平板上後，接種褐根病菌，於 24℃無光照定溫箱中培養 4 d 後，將聚碳酸酯膜取出。以硫酸銨 (ammonium sulfate) 之飽和水溶液為測試劑，浸潤測試平板，具有蛋白分解酵素者，去除薄膜之平板上會出現透明澄清環。測量澄清環大小，並以無接種褐根病菌者為對照處理。無反應者為白色，無澄清環。

磷酸分解酵素 (phosphatase; Hankin & Anagnostakis 1975)：配製 PhTM 培養基，以 2.35% Plate Count Agar (PCA, Difco, USA) 為基礎培養基，滅菌前，以 1 N HCl 調至酸鹼值為 pH 6.0，滅菌後每 980 mL 培養基加入 20 mL 之 0.01 M PhT [α-Nitrophenyl phosphate disodium (Sigma, USA)] 溶液為基質。固態平板製做後，將聚碳酸酯膜覆蓋平板上，接種褐根病菌菌絲塊，於 24℃無光照定溫箱中培養 4 d。取出聚碳酸酯膜後，以 28% NH_4OH (氨水) 為測試染劑，倒入培養皿內，產生酵素的部份，呈現桃紅色。測量桃紅色暈圈大小，並以無接種褐根病菌為對照處理。無酵素產生者無呈色反應。

尿素分解酵素 (urease; Hankin & Anagnostakis 1975)：以 2.35% PCA 為基礎培養基，1% 尿素 (urea) 為基質。滅菌前之 PC 以 1 N HCl 將酸鹼值調為 pH 6.0，滅菌後加入經過 0.22 μm 孔徑過濾膜消毒之 50% (w/v) 尿素 (Sigma, USA)，使最終濃度為 1%，之後製成平板。再將聚碳酸酯膜覆蓋其上後，接種褐根病菌，於 24℃無光照定溫箱中培養 5 d 後，將聚碳酸酯膜取出，每皿加入 10 mL 尚未凝固的 1% 普魯氏藍 (bromothymol blue) 偵測液覆蓋測試平板。普魯氏藍液之配製為 100 mL 之磷酸緩衝溶液 (phosphate buffer, 0.01 M, pH 6.0) 中含有 1 g 尿素、0.5 mL 1% bromothymol blue 及 1.5 g 瓊脂粉，以 1 N HCl 將酸鹼值調 pH 6.0。偵測溶液凝固後呈橘黃色，靜置 2 h 後，觀察偵測層是否有變色，如有尿素分解酵素產生會形成藍綠色至深藍紫色暈環，無酵素者之顏色仍為橘黃色。測量藍紫色反應環大小，並以無接種褐根病菌者為對照處理。

脂質分解酵素 (lipase; Hankin & Anagnostakis 1975)：以蛋白凍瓊脂 (peptone agar) 為基礎培養基，Tween 20 為基質。每公升 PCA 含有 10 g peptone (Difco, USA)、5 g NaCl、0.1 g $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ 及 20 g 瓊脂粉，滅菌前以 1 N HCl 將酸鹼值調為 pH 6.0，經高溫高壓滅菌後，等培養基降溫至 45–50℃時，加入 1% 之 Tween 20 (經高溫高壓滅菌)，然後製成平板。再將聚碳酸酯膜覆蓋其上，接種褐根病菌，於 24℃無光照定溫箱中培養 7 d 後，將聚碳酸酯膜取出，直接觀察去除薄膜之平板上是否有白色沉澱物產生。測量白色沉澱環大小，並以無接種褐根病菌者為對照處理。

磷脂分解酵素 (phosphatidase)：以大豆卵磷脂 (soybean lecithin，台灣台糖公司) 為基質，配製大豆卵磷脂培養基。先將 1 g 大豆卵磷脂溶於 100 mL 蒸餾水中，置於冰箱內過夜，使其完全乳化；或以打碎機 (Waring blender, New Hartford, Conn., USA) 經 4,500 rpm 打碎 1 min 後備用。將 1% 卵磷脂溶於 0.05 M 磷酸緩衝液 (pH 5.4) 中，添加 0.04% 硫酸鎂 ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$) 及 2% 瓊脂粉，滅菌後製成平板，將聚碳酸酯膜覆蓋於平板上，接種褐根病菌，於 24℃無光照定溫箱中培養 5 d 後，將聚碳酸酯薄膜取出，觀察去除薄膜

之平板上是否有白色沈澱環形成。測量白色沈澱環大小，並以無接種褐根病菌者為對照處理。

幾丁質分解酵素 (chitinase; Hankin & Anagnostakis 1975)：以幾丁質 (chitin) 為基質，將 20 g 粗幾丁質 (crude chitin, Sigma, USA) 浸泡於 100 mL 之 50% 硫酸 (hydrogen sulfate) 溶液中約 24 h，不斷攪拌，當幾丁質呈褐色濃稠狀時，倒入 1 L 容器內，加滿蒸餾水，待幾丁質沉澱後，倒掉上層雜質，再加入蒸餾水重覆洗滌數次，直到幾丁質呈乳白色懸浮狀，酸鹼值為中性時為止。再以網篩 (60 mesh) 過濾 3–4 次後，加入礦物鹽與瓊脂粉，製作幾丁質培養基，並以 1 N NaOH 將酸鹼值調為 pH 8.0 後滅菌。每公升幾丁質培養基含有純化過幾丁質 (相當於 20 g 粗幾丁質)、0.7 g K_2HPO_4、0.5 g KH_2PO_4、0.5 g $MgSO_4$、0.01 g $FeSO_4 \cdot 7H_2O$、0.001 g $ZnSO_4$、15 g 瓊脂粉。滅菌後的幾丁質培養基製成平板後，將聚碳酸酯膜覆蓋其上，接種褐根病菌，於 24℃無光照定溫箱中培養 4 d 後，將聚碳酸酯膜取出，觀察去除薄膜之平板上是否有澄清環出現。測量澄清環大小，並以無接種褐根病菌者為對照處理。

木質分解酵素 (laccase, p-diphenol oxidase; Niku-Paavola & Raaska 1990)：以酵母麥芽抽出培養基 (yeast extract-malt extract agar; YMEA) 為基礎培養基，每公升含 20 g 麥芽抽出物 (malt extract) (Difico, USA)、1 g 酵母抽出物 (yeast extract)、15 g 洋菜粉。YMEA 培養基經高溫高壓殺菌釜消毒後，在培養基約為 45–50℃時，每皿加入 10 g 木屑麥麩基質 [80% 鋸木屑 (saw dust)、20% 麥麩 (wheat bran)，含水量 65–70%，先以 100℃滅菌 1.5 h]，稱為 S-YMEA 培養基，然後製成平板。將聚碳酸酯膜平鋪於平板上後，接種褐根病菌，於 24℃定溫箱中培養 7 d 後，將聚碳酸酯膜取出，再以濃度 11,000 ppm ABTS [2, 2'-azino-di (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid), Sigma, USA] 測試劑浸潤染色，並佈滿培養皿表面，染色 10 min 後觀察菌落是否變為藍綠色。調查方法分為 4 個等級，0 級：無變色 (無產生分解酵素)；1 級：僅培養皿中央變色；2 級：至菌落外緣變色；3 級；培養皿全部變色。並以無接種褐根病菌者為對照處理。

統計分析方法

所有分泌酵素之活性測試結果先進行變方分析 (ANOVA)，再以最小顯著差異性 (Fisher's least significant difference; LSD) 測驗，分析各處理在 5% 顯著下之差異。

結果

澱粉分解酵素

經測試供試之 5 個褐根病菌株在培養 4 d 後，其去除薄膜的培養基經碘液染色後均出現明顯的澄清環 (圖 1A)，顯示各菌株皆能分泌大量的澱粉分解酵素，但以南投中興櫸木菌株 (PN18.1) 形成的澄清環最大，平均直徑達 4.85 cm，而以高雄阿蓮印度棗菌株 (PNZ1.1) 形成的澄清環最小，平均直徑僅 3.43 cm，兩者達 5% 顯著性差異。其他菌株形成之澄清環介於兩者之間，均未達顯著性差異 (表 1)。

纖維素分解酵素

經測試供試之 5 個褐根病菌株皆能分泌纖維分解酵素 (圖 1B)，其中以南投水里葡萄菌株 (PNG1.1) 及高雄甲仙梅樹菌株 (PNP1.1) 分泌的酵素活性較強，經剛果紅測試後之澄清環直徑在 8 cm 以上，而其他三菌株南投中興櫸木菌株 (PN18.1)、南投國姓木麻黃 (PN22.1) 及高雄阿蓮印度棗菌株 (PNZ1.1) 分泌的酵素活性相對較低，澄清環直徑在 6 cm 以下，兩類菌分泌纖維分解酵素的差異達 5% 顯著性差異 (表 1)。

果膠分解酵素

供試之 5 個褐根病菌株在果膠酵素基質培養基生長後，經十六烷基三甲基溴化銨測試劑反應後均會出現明顯的澄清環 (圖 1C)，證實供試菌株皆能分泌兩種果膠分解酵素，但菌株間分泌酵素的能力則有顯著性差異。

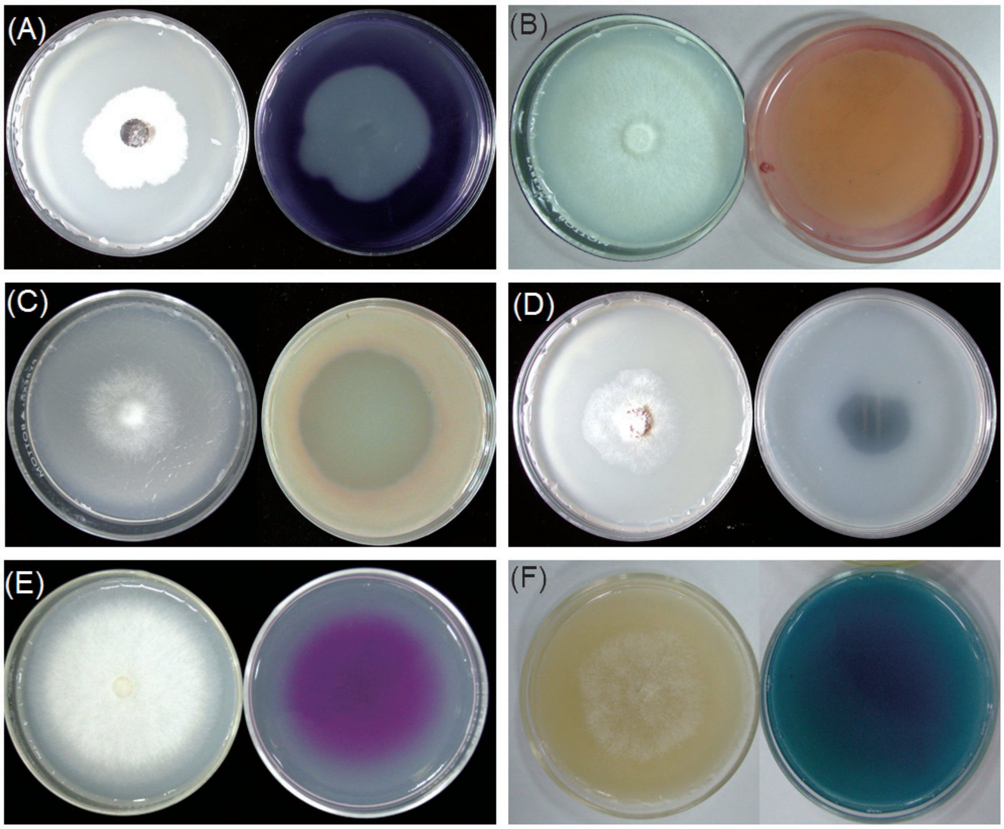

圖 1. 褐根病菌在覆蓋聚碳酸酯膜之固態基質培養基上產生細胞外泌酵素之檢測情形。(A) 澱粉分解酵素；(B) 纖維素分解酵素；(C) 果膠分解酵素；(D) 蛋白質分解酵素；(E) 磷酸分解酵素；及 (F) 尿素分解酵素。圖左為褐根病菌在酵素基質培養基上於 24℃生長 4–5 d 之情形，圖右為移除聚碳酸酯薄膜後測試酵素活性之情形。

Fig. 1. *In vitro* detection of extracellular enzymes (A–F) secreted by *Phellinus noxius*. on solid agar. *P. noxius* was inoculated on a polycarbonate membrane which was placed on solid agar media amended with specific enzyme-reaction substrate in each Petri dish and the cultures were incubated at 24℃ for 4–5 days (A–F, left dish), and appearance of enzyme activity (A–F, right dish) after removal of membrane and fungus and stained the media with test reagents. (A) Amylase; (B) Cellulose; (C) Pectinase; (D) Protease; (E) Phosphatase; and (F) Urease.

在 polygalacturonase (PG) 部分，以南投中興新村櫸木分離之菌株 (PN18.1) 活性最強，澄清環直徑達 5.75 cm；其他菌株分泌酵素的能力相對較弱，澄清環直徑在 2.45–3.55 cm 之間，兩者達 5% 顯著性差異 (表 1)。而在 pectate transeliminase (PTE) 方面，亦以南投中興新村櫸木菌株 (PN18.1) 的活性最強，澄清環直徑達 5.63 cm；高雄阿蓮印度棗分離之菌株 (PNZ1.1) 活性最弱，澄清環直徑僅 1.13 cm，兩者達 5% 顯著性差異；其他菌株的酵素活性則居於兩者中間，但與兩者亦達 5% 顯著性差異 (表 1)。

蛋白質分解酵素

供試之 5 個褐根病菌株在酵素基質培養基生長後，去除薄膜與菌絲，倒入硫酸銨溶液測試，均能形成澄清環 (圖 1D)，顯示供試菌株皆能分泌蛋白分解酵素，其中以南投國姓木麻黃菌株 (PN22.1) 活性相對較強，澄清環直徑達 4.1 cm，比其餘四菌株的酵素活性顯著 (5%) 為強，其餘四菌株形成的澄清環直徑均在 2.7 cm 以下，四菌株間無顯著性差異 (表 1)。

表 1. 不同褐根病菌菌株在固態培養基上分泌各種細胞外泌酵素之測定。

Table 1. Production of extracellular enzymes from five isolates of *Phellinus noxius* collected from different hosts at different locations in Taiwan.[z]

Isolate no.	Host	Location	Diameter of reaction zone (cm)										
			Amylase	Cellulase	Polygalacturonase	Pectate transeliminase	Protease	Phosphatase	Urease	Lipase	Phosphatidase	Chitinase	Laccase[y]
PN22.1	*Casuarina equisetifolia* (ironwood tree)	Guosing, Nantou	4.08 ab[x]	4.50 b	2.60 b	4.05 b	4.10 a	5.00 a	8.50 a	4.83 a	0	0	3
PNG1.1	*Vitis vinifera* (grape)	Shueili, Nantou	4.10 ab	8.20 a	3.55 b	2.95 b	2.68 b	4.20 a	6.80 a	4.80 a	0	0	3
PN18.1	*Zelkova serrata* var. *Serrat* (zelkova)	Chungsin, Nantou	4.85 a	5.90 b	5.75 a	5.63 a	1.93 b	2.94 b	2.84 b	3.93 a	0	0	3
PNP1.1	*Prunus mume* (plum)	Jiasian, Kaohsiung	3.93 ab	8.10 a	2.70 b	3.43 b	2.20 b	2.80 b	2.10 b	2.13 b	0	0	3
PNZ1.1	*Zizyphus mauritiana* (Indian Jujube)	Alian, Kaohsiung	3.43 b	4.18 b	2.45 b	1.13 c	2.23 b	5.20 a	1.97 b	3.43 ab	0	0	3

[z] Isolates of *P. noxius* were cultured on various solid media amended with respective enzyme-producing substrates at 24℃ for 4–5 days.
[y] Activity of laccase, 0: no green-blue zone; 1: green-blue zone < 1 cm diam.; 2: green-blue zone = colony diam.; 3: green-blue zone up to the edge of Petri dish.
[x] Means followed by the same letters within the same column were not significantly different at $P \geq 0.05$ level according to LSD (least significant difference) test.

磷酸分解酵素

供試之 5 個褐根病菌株皆能分泌磷酸脂分解酵素，惟分解酵素的能力有顯著之強弱差異。供試菌株在測試酵素基質培養基生長後，去除聚碳酸酯膜後，再以氨水染色，均可產生桃紅色暈圈 (圖 1E)，其中以阿連印度棗菌株 (PNZ1.1)、國姓木麻黃菌株 (PN22.1) 及水里葡萄菌株 (PNG1.1) 分泌的酵素活性較強，桃紅色暈圈的直徑均在 4.0 cm 以上，該三菌株間無顯著性差異，但比其餘兩菌株的酵素活性顯著為強 (表 1)。其餘兩菌株的酵素活性較差，桃紅色暈圈直徑在 3.0 cm 以下，但兩者間無顯著性差異。

尿素分解酵素

供試之 5 個褐根病菌株在酵素基質培養基生長後，去除薄膜的培養基，再倒入尚未凝固的普魯氏藍偵測液覆蓋培養基，均會形成藍綠色 (圖 1F)，顯示供試菌株皆能分泌尿素分解酵素，其中以南投國姓木麻黃菌株 (PN22.1) 活性最強，藍綠圈直徑達 8.5 cm，覆蓋整個培養基；水里葡萄菌株 (PNG1.1) 次之，藍綠圈直徑達 6.8 cm，比其餘三個菌株的酵素活性顯著為強，且達顯著性差異 (5%) (表 1)。其餘三菌株的反應圈直徑均在 3.0 cm 以下，彼此間未達顯著性差異。

脂質分解酵素

供試之 5 個褐根病菌株皆能分泌脂質分解酵素，在酵素基質培養基上產生明顯的白色沈澱圈 (圖 2)。依形成白色沈澱圈大小排序，依序為國姓木麻黃菌株 (PN22.1) (直徑 4.83 cm)、水里葡萄菌株 (PNG1.1) (直徑 4.8 cm)、中興櫸木菌株 (PN18.1) (直徑 3.93 cm)、阿連印度棗菌株 (PNZ1.1) (直徑 3.43 cm) 及甲仙梅子菌株 (PNP1.1) (直徑 2.13 cm)，依據統計分析，前三菌株與最後一菌株形成的白色沈澱圈大小達 5% 顯著性差異，但前四菌株間無顯著性差異，而後兩菌株間亦無差異 (表 1)。

磷脂分解酵素

供試之 5 個褐根病菌株培養在供試固態基質培養基上，皆未檢測出細胞外泌磷脂分解酵素之活性。

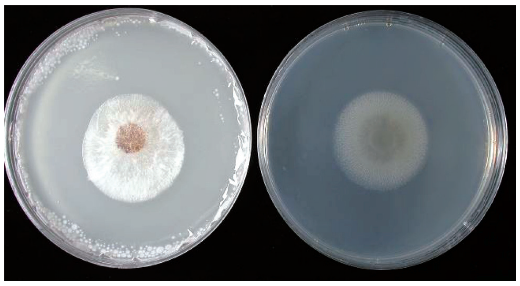

圖 2. 褐根病菌在覆蓋聚碳酸酯膜之固態培養基上產生細胞外脂質分解酵素之情形。圖左為褐根病菌在酵素基質培養基上於 24℃生長 7 d 之情形，圖右為移除聚碳酸質薄膜後之酵素呈現情形。

Fig. 2. Production of lipase by *Phellinus noxius* on solid agar medium *in vitro*. Note colony morphology (left dish) of *P. noxius* grown at 24 ℃ for 7 d on polycarbonate membrane which was placed on peptone agar amended with Tween 20 and the appearance of lipase activity (right dish) after removal of membrane and fungal culture.

幾丁質分解酵素

供試之 5 個褐根病菌株培養在供試固態基質培養基上，皆未檢測出細胞外泌幾丁質水解酵素之活性。

木質分解酵素

供試之 5 個褐根病菌株在 S-YMEA 酵素基質培養基生長後，去除薄膜的培養基，再倒入 ABTS 染劑浸潤染色，整個培養基均呈深藍綠色 (圖 3)，顯示供試菌株皆能分泌 laccase，且分泌酵素的能力相同，級數均為最高級 3 (表 1)。

討論

酵素在生物的生活行為中扮演重要的角色，尤其在病原微生物方面，它不但是分解與利用食物的利器，也是攻擊與入侵寄主的重要工具之一。有關植物病原酵素的研究報告非常多，而可供用於酵素檢測的方法多達十數種，其中 Hankin & Anagnostakis (1975, 1977) 開發的酵素固體培養基檢測方法，可以

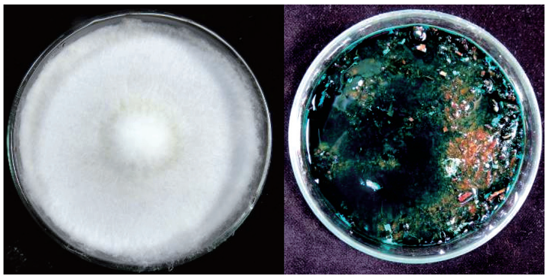

圖 3. 褐根病菌在覆蓋聚碳酸酯膜之 S-YMEA 固態培養基上產生細胞外泌 laccase (一種木質分解酵素) 之檢測情形。圖左為褐根病菌在酵素基質培養基上於 24℃生長 7 d 之情形，圖右為移除聚碳酸質薄膜後經 ABTS 染色之情形。

Fig. 3. Detection of laccase secreted by *Phellinus noxius* on solid agar medium *in vitro*. Note colony morphology (left dish) of *P. noxius* grown at 24 ℃ for 7 d on polycarbonate membrane which was placed on yeast extract-malt extract agar amended with wheat bran plus saw dust substrate (S-YMEA) and the appearance of laccase activity (right dish) after removal of membrane and fungal culture and stained the media with ABTS solution.

快速且簡便的檢測真菌與多種微生物產生的多種細胞外泌酵素 (extracellular enzymes) 的能力，包括 amylase、cellulase、pectinases (PG 與 PTE)、protease、phosphatase、urease 及 chitinase 等。在本試驗中，利用該等方法，也可以檢測褐根病菌產生多種細胞外泌酵素的能力。惟褐根病菌的菌絲在固體培養基上生長密實，且產生深褐色色素，嚴重阻礙酵素反應的觀察與判讀，因此配合 Chang *et al.* (1992) 開發的改良方法，在基質培養基上鋪上一層聚碳酸酯薄膜，再接種菌絲塊。由於薄膜的孔徑只有 0.2 μm，可以阻隔褐根病菌菌絲長入培養基中，但不會阻隔病菌分泌的細胞外泌酵素滲入培養基中 (因酵素的分子量相對較小，可以通過薄膜的小孔)。當進行酵素反應前，只要將薄膜移除，再將酵素反應偵測液加入浸潤基質培養基，即可清晰的判讀多種酵素的分泌情形；而 lipase 的判讀無需另加測試劑，在薄膜移除後即可清晰的觀察與判讀是否有白色沈澱物的形成。利用上述改良的酵素測定方法，證實本試驗供試之 5 株褐根病菌在固態培養基上均可以分泌 8 種細胞外分解酵素，包括 amylase、cellulase、pectinases (PG 與 PTE)、protease、phosphatase、urease 及 lipase，但都不能分泌 phosphatidase 與 chitinase (表 1)，顯示 5 株代表性供試菌株雖然分離自不同地點與不同寄主，但能分泌或不能分泌某些特定酵素 (本試驗測定之 10 種生體外酵素) 的特性均具有相當的一致性，不受地域與寄主種類的影響。然而，5 株供試菌株雖然均可以分泌上述 8 種細胞外泌酵素，但分泌酵素的能力在菌株間卻有強弱的差異，且經常達 5% 顯著性差異水準，且分泌不同酵素能力的強弱差異在菌株間亦不盡相同 (表 1)，例如南投中興櫸木菌株 PN18.1 分泌 amylase 與 pectinases (PG 與 PTE) 的能力較強，南投國姓木麻黃菌株 PN22.1 分泌 protease、phosphatase、lipase 及 urease 的能力較強，南投水里葡萄菌株 PNG1.1 分泌 cellulase 與 lipase 的能力較強，而高雄甲仙梅樹菌株 PNP1.1 與高雄阿蓮印度棗菌株 PNZ1.1 分別分泌 cellulase 與 phosphatase 的能力較強。至於影響菌株間分泌酵素能力差異的原因是否與遺傳或其他因子有關，則尚需進一步探討。

為害樹木，造成木材腐朽的擔子菌 (wood decay fungi) 可以分成兩大類，包括白腐菌 (white rot fungi) 與褐腐菌 (brown rot fungi)，主要的區別為前者除可分解細胞壁的纖維質 (cellulose) 與半纖質 (semicellulose) 外，而且還能分解木質素 (lignin) (Kirk & Kelman 1965; Blanchette1991)。Laccase 為木質分解酵素 (ligninase) 的一種，在病菌侵入寄主分解木材組織上扮演重要的角色，此種 laccase 酵素只有能分泌木質素分解酵素之真菌才會產生 (Intini 1991; Tuora *et al.* 1995)。在 1980 年代，Geiger *et al.* (1985, 1986a) 從事為害橡膠 (*Hevea brasiliensis*) 造成根部腐朽的病原菌 [*Rigidoporus lignosus* 與褐根病菌 (*P. noxius*)] 的病原酵素研究，發現褐根病菌可以分泌 laccase，導致木材腐朽，因此認為該菌應該歸屬為白腐病菌。在本試驗中，改良 Niku-Paavola & Raaska (1990) 開發的 laccase 固態培養基快速檢測法，亦證實存在台灣的褐根病菌菌株亦可分泌 laccase，分解添加在培養基中鋸木

腐的木質素，而且供試菌株分泌 laccase 的能力均很強，達到最高級數 3，且菌株間之間並無顯差異 (表 1)。在試驗的同時，以一株為害番椒的疫病菌 (*Phytophthora capsici*) 為對照組，結果發現反應後的培養基並無變色，顯示疫病菌菌株不會產生 laccase，並非白腐病菌 (資料未顯示)。

除 laccase 外，褐根病菌分泌其他酵素的研究並不多，Geiger *et al.* (1985, 1986b) 報告為害橡膠的褐根病菌可分泌 phosphatase、peroxydase 及數種分解多糖類的酵素，包括 carboxymethyl (CM)-cellulase, pectinases, β-glucosidase, α- & β-galactosidase, xylanase及laminarinase等。利用固態培養基快速檢測法，本報告則發現台灣的褐根病菌除可分泌 cellulase、pectinases (PG & PTE) 及 phosphatase 之外，更可分泌 amylase、protease 及 urease，但都不能分泌 phosphatidase 與 chitinase (表 1)。

Phellinus noxius 為台灣果樹、林木的重要根部病原菌，寄主範圍十分廣泛，受害作物不下百餘種，為台灣木本植物的頭號殺手 (Ann *et al.* 2002; Tsai 2008)。先前的試驗報告均指出褐根病菌的致病力甚強，一年生枇杷在接種半年後，即會有 50% 的植株死亡 (Tsai 2008)；而接種褐根病菌的枇杷莖部片段 (直徑 1–1.5 cm)，在接種三個月後即會完全腐朽，供做接種原使用 (Tsai 2008)。本試驗發現台灣褐根病菌分泌 laccase 的能力非常強，這是否與褐根病菌在台灣大肆為害有關，尚需進一步探討。

引用文獻

Ann, P. J., H. L. Lee, and J. N. Tsai. 1999a. Survey of brown root disease of fruit and ornamental trees caused by *Phellinus noxius* in Taiwan. Plant Pathol. Bull. 8:51–60. (in Chinese with English abstract)

Ann, P. J., H. L. Lee, and T. C. Huang. 1999b. Brown root rot of ten fruit trees caused by *Phellinus noxius* in Taiwan. Plant Dis. 83:746–750.

Ann, P. J., T. T. Chang, and W. H. Ko. 2002. *Phellinus noxius* brown root rot of fruit and ornamental trees in Taiwan. Plant Dis. 86:820–826.

Ann, P. J. and W. H. Ko. 1992. Decline of longan trees: Association with brown root rot caused by *Phellinus noxius*. Plant Pathol. Bull. 1:19–25.

Chang, T. T. 1992. Decline of some forest trees associated with brown root rot caused by *Phellinus noxius*. Plant Pathol. Bull. 1:90–95.

Chang, T. T. 1995. Decline of nine tree species associated with brown rot root caused by *Phellinus noxius* in Taiwan. Plant Dis. 79:962–965.

Chang, T. T., X. Y. Yang, and W. H. Ko. 1992. A sensitive method for detecting production of extracellular enzymes by fungi on solid media. Mycologia 84:923–926.

Cunningham, G. H. 1965. Polyporaceae in New Zealand. N. Z. Dept. Sci. Ind. Res. Bull. 164:1–304.

Geiger, J. P., M. Nicole, D. Nandris, and B. Rio. 1985. The aggression of *Hevea brasiliensis* by *Rigidoporus lignosus* and *Phellinus noxius*: Some biochemical events. Eur. J. For. Pathol. 15:316–319.

Geiger, J. P., B. Rio, D. Nandris, and M. Nicole. 1986a. Laccases of *Rigidoporus lignosus* and *Phellinus noxius*. I. Purification and some physicochemical properties. Appl. Biochem. Biotechnol.12:121–134.

Geiger, J. P., B. Rio, D. Nandris, and M. Nicole. 1986b. Polysaccharide degrading enzymes excreted by two root rot fungi. Symbiosis 2:337–340.

Hankin, L. and S. L. Anagnostakis. 1975. The use of solid media for detection of enzyme production by fungi. Mycologia 67:597–607.

Hankin, L. and S. L. Anagnostakis. 1977. Solid media containing carboxymethylcellulose to detect c_x cellulase activity of microorganisms. J. Gen. Microbiol. 98:109–115

Intini, M. G. 1991. Some common species of tropical lignicolous fungi. Intl. J. Trop. Plant Dis. 9:1–14.

Kirk, T. K. and A. Kelman. 1965. Lignin degradation as related to the phenoloxidases of selected wood-destroying basidiomycetes. Phytopathology 55:739–745.

Niku-Paavola, M. L. and L. Raaska.1990. Detection of white-rot fungi by a non-toxic stain. Mycol. Res. 94:27–31.

Pegler, D. N. and J. M. Waterston. 1968. *Phellinus noxius* No. 195. *in*: Descriptions of Pathogenic Fungi and Bacteria. Commonw. Mycol. Inst., Kew, London.

Sawada, K. 1928. Camphor tree decline. Descript. Catal. Formosan Fungi 4:86–91.

Schaad, N. W. 1980. Laboratory Guide for Identifica-

tion of Plant Pathogenic Bacteria. APS Press. St. Paul. 72 pp.

Tsai, J. N. 2008. Biological Characteristics of *Phellinus noxius* and its Molecular Methods for Diagnosis. Doctoral Dissertation, Department of Plant Pathology, National Chung Hsing University. Taichung. 135 pp. (in Chinese)

Tsu, S. T., T. C. Chang, C. A. Chang, J. L. Tsai, and T. T. Tsay. 2002. List of Plant Diseases in Taiwan. 4th ed. Taiwan Phytopathol. Soc. Pub., Taichung. 386 pp. (in Chinese)

Tuora, U., K. Winterhalter, and A. Fiechter. 1995. Enzymes of white-rot fungi involved in lignin degradation and ecological determinants for wood decay. J. Biotechnol. 41:1–17.

Use of Polycarbonate Membrane for Detection of Extracellular Enzymes of *Phellinus noxius* on Solid Media

Jyh-Nong Tsai[1], Shou-Fong Cheng[2], Huei-Lin, Tsai[2], Hung-Chang Huang[3], Wen-Hsui Hsieh[4], and Pao-Jen Ann[5,*]

Abstract

Tsai, J. N., S. F. Cheng, H. L. Tsai, H. C. Huang, W. H. Hsieh, and P. J. Ann. 2013. Use of polycarbonate membrane for detection of extracellular enzymes of *Phellinus noxius* on solid media. J. Taiwan Agric. Res. 62(2):184–194.

Brown root rot caused by *Phellinus noxius* is one of the most serious diseases associated with decline of fruit trees and ornamental woody trees in Taiwan. The objective of this study was to develop a modified polycarbonate membrane method for detection of extracellular enzymes produced by *P. noxius* growing on solid agar media. Five isolates of *P. noxius* collected from different host plants in Taiwan were used in this study, including isolate PN22.1 from ironwood (*Casuarina equisetifolia*) at Guosing, Nantou, isolate PNG1.1 from grapevine (*Vitis vinifera*) at Shueili, Nantou, isolate PN18.1 from zelkova (*Zelkova serrata* var. *serrat*) at Chungsin, Nantou, isolate PNP1.1 from plum (*Prunus mume*) at Jiasian, Kaohsiung and isolate PNZ1.1 from Indian jujube (*Zizyphus mauritiana*) at Alian, Kaohsiung. They were tested for production of extracellular enzymes by growing each isolate on polycarbonate membrane disc (0.2 μm in pore diam.) which was placed on PDA amended with enzyme-reaction chemicals for detection of enzymes. Results showed that eight extracelluar enzymes, including amylase, cellulase, pectinases (polygalacturonase and pectate transeliminase), protease, phosphatase, lipase and laccase, were detected in all the five isolates of *P. noxius*, but no phosphatidase and chitinase were detected from these isolates. Among the eight enzymes detected, the level of laccase secreation was high in all the five isolates, but the level of secretion of other seven enzymes varied with the isolates tested. The technique for detection of enzymes can be applied to pathogenecity analysis in *P. noxius* and other fungi.

Key words: Brown root rot, *Phellinus noxius*, Extracellular enzymes, Laccase, Polycarbonate membrane.

Received: March 1, 2013; Accepted: May 2, 2013.
[*] Corresponding author, e-mail: pjann@tari.gov.tw
[1] Associate Research Fellow, Plant Pathology Division, Taiwan Agricultural Research Institute, Taichung, Taiwan, ROC.
[2] Research Assistants, Plant Pathology Division, Taiwan Agricultural Research Institute, Taichung, Taiwan, ROC.
[3] Distinguished Research Fellow, Plant Pathology Division, Taiwan Agricultural Research Institute, Taichung, Taiwan, ROC.
[4] Professor, Department of Plant Pathology, National Chung Hsing University, Taichung, Taiwan, ROC.
[5] Research Fellow and Director, Plant Pathology Division, Taiwan Agricultural Research Institute, Taichung, Taiwan, ROC.